

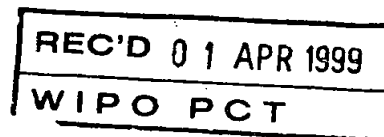
178

DE 99/00175

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

SBA

DE 99/00175



5

**Bescheinigung**

Die Herren Dr. Florian Kern, Dr. Alexander Scheffold, Dr. Rainer Blaszyk, Professor Dr. Hans-Dieter Volk und Professor Dr. Peter Walden, alle in Berlin/Deutschland, haben eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden  
Proteinfragmenten"

am 28. Juli 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 12 Q, G 01 N und C 12 P der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 24. März 1999

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Hoß

Aktenzeichen: 198 34 932.7

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

### Zusammenfassung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten mit den folgenden Schritten:

- 5        a)    Ermitteln der Aminosäuresequenz eines Antigens,
- b)    Unterteilen der gefundenen Aminosäuresequenz des Antigens in  
              Proteinfragmente,
- c)    Synthetisieren von mindestens einem Proteinfragment
- 10        d)    Inkubieren einer T-Zell enthaltenden Suspension mit den  
              Proteinfragmenten,
- e)    Identifizieren  
              von einem induzierten T-Zell-Zytokin oder Aktivierungsmarker,  
              durch Durchflußzytometrie, und
- 15        f)    Zuordnen der T-Zellen, bei denen T-Zell-Zytokine und / oder  
              Aktivierungsmarker identifiziert wurden, zu den Proteinfragmenten,  
              welche mit den T-Zellen inkubiert wurden.

Mit Hilfe der ermittelten positiven Sequenz werden die entsprechenden Proteinfragmente synthetisch hergestellt und lassen sich zur Herstellung eines Medikamentes zur Immunstimulation verwenden.

20

25

30

## Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten

Die Erfindung umfaßt ein Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten mit Hilfe einer T-Zell-Induktion, ein Verfahren zur Herstellung von Proteinfragmenten mit einer Sequenz, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gefunden wurde, und eine Verwendung dieser Proteinfragmente zur Immunstimulation.

10

### Stand der Technik

Die T-Zell-stimulierenden Proteinfragmente umfassen T-Zell-Epitope, die von T-Zell-Rezeptoren spezifisch erkannt werden und mittels dieser Erkennung unter anderem die T-Zellen zur Biosynthese von Zytokinen, die üblicher Weise sekretiert werden, anregt.

15

Eine bekanntes Verfahren zur Identifizierung von T-Zell stimulierenden Proteinfragmenten besteht darin, daß ein Protein, dessen Aminosäure-Sequenz bekannt ist, in einzelne überlappende Proteinfragmente aufgeteilt wird. Je eine Gruppe identischer, synthetisch hergestellter Proteinfragmente wird mit T-Zellen inkubiert. Nach ein bis drei Wochen liegen gegebenenfalls Zell-Linien oder Zell-Klone vor, die spezifisch durch mindestens ein Proteinfragment stimuliert werden konnten. Aufgrund der Versuchsanordnung können die stimulierten Zell-Linien oder Zell-Klone den entsprechenden T-Zell stimulierenden Proteinfragmenten zugeordnet werden. Diese Methode ist ausführlich in P. WALDEN et al. (1996) Current Opinion in Immunology, Vol. 8, pp 68-74 beschrieben.

20

25

Nachteil dieser Methode ist, daß ein großer Zeitraum zwischen Beginn des Versuchs und dessen Endergebnissen liegt. Ein hoher apparativer und personeller Aufwand ist erforderlich. Außerdem ist es wahrscheinlich, daß Zellen absterben und falsch negative Ergebnisse daraus resultieren.

30

Ein Verfahren zur Identifizierung von Antigen-stimulierten T-Zellen nach S. L. WALDROP et al. (1997) Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. J Clin. Invest. Vol 99, pp 1739-1750

35

besteht darin, daß Proteine als Antigen mit peripheren mononukleären Zellen (PBMC = peripheral blood mononuclear cells) inkubiert werden. Dabei werden die vollständigen Proteine von Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert. Diese Prozessierung findet in den Antigen-präsentierenden Zellen statt, sie führt zu Fragmenten, deren Sequenzen in der Versuchsanordnung unbekannt bleiben. Die Beladung der MHC-Moleküle mit den mit MHC-Klasse-II-Molekülen präsentierten Proteinfragmenten erfolgt entsprechend der Gegebenheiten der prozessierenden Zellen. Die entsprechend stimulierten T-Zellen werden durchflußzytometrisch identifiziert. Dabei ist nicht feststellbar, welches Proteinfragment welche T-Zellen induziert hat. Ein Zuordnung von spezifischen T-Zell-Klonen und bestimmten Proteinfragmenten ist nicht möglich. Ziel dieser Methode und Publikation war es, nachzuweisen, daß sich eine bestimmte Anzahl an Zellen in einer T-Zell-Population befindet, die auf prozessierte T-Zell-Epitope aus einem bestimmten Antigen mit einer Immunantwort reagieren. Die Anzahl der in dieser Versuchsanordnung virusspezifisch positiven CD4+ -T-Zellen betrug etwa 1%.

Nachteil dieser Methode ist, daß die prozessierten Proteinfragmente in ihrer Sequenz völlig unbekannt sind. Es handelt sich daher um eine Methode, mit der sich lediglich feststellen läßt, daß Epitope in einem Protein oder komplexen Antigen vorhanden sind. Weder die entsprechende Aminosäure-Sequenz, läßt sich bestimmen, noch die Häufigkeit der Epitope. Ebenso wenig lassen sich mit dieser Methode Epitope für MHC-Klasse-I-restringierte T-Lymphozyten bestimmen.

### Aufgabe und Lösung

25

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren anzubieten, mit dem Proteinfragmente, welche T-Zellen stimulieren und deren Aminosäure-Sequenzen bekannt sind, in kurzer Zeit als stimulierende Proteinfragmente zu identifizieren. Dabei soll die Methode auch bei kleiner Anzahl an T-Zell arbeiten, ohne daß T-Zell-Klone zur Verfügung stehen müssen. Weiterhin soll es möglich sein, aus einer großen Anzahl an Proteinfragmenten, diejenigen herauszufinden, welche T-Zellen stimulieren.

35

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, die folgenden Schritte umfassend:

- a) Ermitteln der Aminosäuresequenz eines Antigens,  
welches ein Protein oder Peptid ist,
- 5 b) Unterteilen der gefundenen Aminosäuresequenz des Antigens in Proteinfragmente,
- c) Synthetisieren von mindestens einem Proteinfragment mit einer Länge von 8 bis 30 Aminosäuren oder Spalten der Aminosäuresequenz des Antigens zu mindestens einem Proteinfragment mit einer Länge von 8 bis 30 Aminosäuren,  
10 dabei ist das Proteinfragment eine Teilsequenz der ermittelten Aminosäuresequenz des Antigens,
- d) Inkubieren einer T-Zell enthaltenden Suspension mit dem oder den Proteinfragmenten in Versuchsansätzen,
- 15 e) Identifizieren
  - (i) von mindestens einem T-Zell-Zytokin,  
das durch das oder die Proteinfragmente induziert und in den T-Zellen synthetisiert wurde,  
dabei liegen das oder die T-Zell-Zytokine intrazellulär vor,  
20 und / oder
  - (ii) von mindestens einem Aktivierungsmarker, der durch das oder die Proteinfragmente induziert oder in seiner Expression gesteigert wurde und in den T-Zellen exprimiert wird,  
dabei kann der Aktivierungsmarker intrazellulär vorliegen oder  
25 auf der Zelloberfläche exprimiert sein
- dabei werden das oder die T-Zell-Zytokine oder Aktivierungsmarker durchflußzytometrisch identifiziert, und
- 30 f) Zuordnen der Versuchsansätze, bei denen T-Zellen stimuliert wurden und diese T-Zell-Stimulation durch das Identifizieren von einem T-Zell-Zytokin oder mehreren T-Zell-Zytokinen und / oder einem oder mehreren Aktivierungsmarkern erkannt wurde, zu der oder den Aminosäuresequenzen der Proteinfragmente, welche mit den T-Zellen inkubiert wurden.

### Vorteile:

- Der Vorteil dieses erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß innerhalb von sehr kurzer Zeit im Vergleich zur konventionellen Methode ein bezüglich der Sequenz bekanntes Proteinfragment als ein T-Zell stimulierendes Proteinfragment identifiziert werden kann. Die Zeit zwischen erster Inkubation von T-Zellen und durchflußzytometrischer Auswertung kann sechs Stunden betragen. Dabei können kleinste Zell-
- 5 Zahlen ausreichen. Wenn mit einer Anzahl von  $1 \cdot 10^8$  peripheren weißen Blutzellen gestartet wird, kann zweifelsfrei eine positive Antwort dann noch festgestellt werden, wenn 0,1% der Ausgangszellzahl stimulierte T-Zellen sind. Dagegen benötigt die
- 10 klassische Methode eine Zellzahl von etwa  $8 \cdot 10^6$  peripheren weißen Blutzellen je Proteinfragment oder Mischung aus Proteinfragmenten, um anschließend einen Zytotoxizitätstest erfolgreich durchführen zu können. Das erfindungsgemäße Verfahren ist also ein Verfahren, welches mit hoher Effizienz zum T-Zell-Epitopmapping von Proteinantigenen eingesetzt werden kann.
- 15 Weiterhin können Gemische aus frisch isolierten zellulären Blutzellen oder Gewebezellen verwendet werden. T-Zell-Linien oder T-Zell-Klone sind nicht für dieses erfindungsgemäße Verfahren notwendig. Hierdurch ergeben sich Zeitvorteile bei der Inkubation und weiterhin sehr wesentlich, ein Vorteil bezüglich der Viabilität der T-
- 20 Zellen, welche in der kurzen Inkubationszeit als großer Pool mit hoher Variabilität vorliegen. Eine Selektion und Proliferation, die mit einer gezielte Eliminierung bestimmter T-Zellen einhergeht, erfolgt aufgrund der kurzen Inkubationszeiten bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht.
- Bevorzugt als Quelle der zu stimulierenden T-Zellen sind solche Spender, welche zuvor eine immunologische Primärantwort gegen das Antigen aufgebaut haben. Dies
- 25 kann beispielsweise im Rahmen einer Infektion stattgefunden haben oder auch im Rahmen einer Immunisierung. Auch bei einer Autoimmunantwort ist diese Situation gegeben.
- Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß der MHC-Typ des Spenders nicht bekannt sein muß. So werden zum Beispiel Proteinfragmente mit 9 Aminosäuren aus einem Protein
- 30 mit den T-Zellen inkubiert, ohne daß man den MHC-Typ des Blut- oder Zellspenders kennt. Dennoch lassen sich die T-Zell stimulierenden Proteinfragmente identifizieren. Somit ist zum Identifizieren des Epitops die Kenntnis des MHC-Typs nicht erforderlich. Beim klassischen Test mittels zytotoxischen T-Zell-Linien oder Klonen müssen die Zielzell-Linien (Target-Zell-Linien) im MHC mit den Effektor-Zellen übereinstimmen.

Das erstellen von Target-Zell-Linien aus Spenderblut bedeutet einen zusätzlichen materiellen und zeitlichen Aufwand.

Weiterhin kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren eine große Anzahl an Proteinfragmenten zur selben Zeit inkubiert werden. Geringe Zell-Zahlen und hochsensitive  
5 Detektion stimulierter T-Zellen erlauben eine zeitlich deutlich vorteilhafte Identifizierung der T-Zell stimulierenden Proteinfragmente.

Da die Anzahl der zu untersuchenden Proteinfragmente aufgrund des geringen notwendigen Arbeitsaufwandes sehr hoch sein kann, ist es nicht notwendig mögliche Epitope mittels theoretischer Vorhersagen einzugrenzen. Die Epitope werden rein  
10 empirisch gefunden, und es können deshalb auch solche T-Zell-Epitope gefunden werden, die sich aufgrund einer theoretischen Voraussage nicht ergeben würden.

Mit diesem Verfahren lassen sich leicht T-Zellen identifizieren, die spezifisch durch bestimmte ausgewählte Proteinfragmente stimulierbar sind.

T-Zell-stimulierende Proteinfragmente binden einerseits an definierte MHC-Moleküle und andererseits enthalten sie Aminosäuresequenzen (Epitope), welche mit der  
15 Antigenbindungsregion des T-Zell-Rezeptors (Paratop) eine Bindung eingehen können.

Die Begriffe Protein oder Peptid haben als wesentliches Merkmal die Sequenz von mindestens neun Aminosäuren. Dabei ist gleichgültig, wie die Sequenz ermittelt  
20 worden ist. So kann bei einem neuen Protein die Sequenz zum erstenmal analysiert werden oder bei bekannten Protein aus einer Datenbank abgelesen werden. Wichtig ist nur, daß die Aminosäuresequenz des Proteinfragments bestimmt ist. Auch die Unterteilung der Protein-oder Peptidsequenz kann unterschiedlich ausfallen. So können die Proteinfragmente schrittweise mit der Variation von einer Aminosäure aus  
25 einem Protein abgeleitet werden. Andere Überlappungen sind ebenfalls denkbar. Es handelt sich dabei um das klassische Verfahren eines Protein-Mappings.

T-Zell enthaltende Suspensionen zeichnen sich dadurch aus, daß sie Zellen enthalten, welche MHC-gebundene Peptide präsentieren können. So können die präsentierenden Zellen neben den Antigen-präsentierenden Zellen auch zum Beispiel  
30 T-Zellen sein,

#### Weitere Ausführungsformen

Vorteilhaft ist das erfindungsgemäße Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimu-  
35 lierenden Proteinfragmenten, da das Identifizieren von mindestens einem

T-Zell-Zytokin oder Aktivierungsmarker auf der Einzelzell-Ebene erfolgt. Schon kleinste Mengen an T-Zellen, welche Zytokine intrazellulär enthalten, reichen aus.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem die T-Zell enthaltenden Suspensionen Zellen enthalten, die das Proteinfragment im wesentlichen mit MHC-Klasse-I oder-II (Haupt Histokompatibilitäts Komplex, MHC = Major Histocompatibility Complex) präsentieren. Neben den zur Verankerung in der Spalte des MHC-Moleküls dienenden Aminosäuren (Bindungsanker) müssen bestimmte Sequenzen vorhanden sein, die von einem T-Zell-Rezeptor spezifisch erkannt werden (T-Zell-Epitope), damit das Proteinfragment als T-Zell-Epitop funktioniert.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem das Proteinfragment bei der Klasse I restringierten Präsentation 9 bis 11 Aminosäuren umfaßt und das Proteinfragment bei der Klasse II restringierten Präsentation mindestens 11 Aminosäuren umfaßt. Es ist bekannt, daß an Moleküle der MHC-Klasse I (MHC = Major Histocompatibility Complex) bindende Proteinfragmente in der Regel eine Länge von 9 Aminosäuren aufweisen, während Proteinfragmente, welche an MHC-Klasse II Moleküle binden, etwas länger und in der Länge stärker variabel sind.

Vorteilhaft ist, daß die Proteinfragmente trotz der kurzen Inkubationszeit von den MHC-Molekülen, die sich auf der Zelloberfläche befinden, ausreichend aufgenommen werden, um eine eindeutige Identifizierung stimulierter T-Zellen nach zum Beispiel sechs Stunden zu ermöglichen. Werden weiterhin kurze Proteinfragmente (Klasse I mit 9 Aminosäuren und Klasse II mit vorzugsweise 11-15 Aminosäuren) verwendet, läßt sich das in einer stimulierenden Aminosäuresequenz vorhandene Epitop maximal eingrenzen.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem die T-Zell enthaltende Suspension eine Suspension ist aus Vollblut, peripheren weißen Blutzellen (PWBC), Milzzellen, Thymuszellen, Knochenmark, Liquor und / oder aus Lymphknotenzellen. Das Verfahren wird erheblich dadurch vereinfacht, daß die T-Zell enthaltenden Suspensionen aus unterschiedlicher Quelle stammen können. Weiterhin ist besonders vorteilhaft, daß eine Aufarbeitung der T-Zellen nicht erforderlich ist. So müssen die T-Zellen nicht angereichert werden, weiterhin ist ein Entfernen oder



Zerstören von anderen Zellen nicht notwendig. Hierdurch läßt sich das erfindungsgemäße Verfahren einfacher routinemäßig handhaben. Das Verfahren ist nicht so störanfällig durch Kulturbedingungen, Kontaminationen, kulturbedingt Selektionen und Selektionierung von spezifischen Klonen wie das konventionelle  
5 Verfahren. Ein repräsentatives Bild von T-Zellen allgemein und T-Zellen, die durch Proteinfragmente stimuliert werden, läßt sich mit diesem Verfahren ermitteln.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem die T-Zell enthaltende Suspension aus den  
10 Patienten, die therapiert werden sollen, aus Spendern oder aus Tieren stammen. Stammt die T-Zell enthaltende Suspension aus einem Patienten, so läßt sich mit der Identifizierung zum Beispiel feststellen, gegen welches T-Zell-Epitop eines Virus-Antigens sich eine T-Zell-Antwort induzieren läßt. Ein solches T-Zell-Epitop kann dann zur Stimulation weiterer T-Zellen des Patienten gezielt eingesetzt werden. Die so  
15 induzierten und zur Proliferation angeregten Zellen können so expandiert und anschließend dem Patienten retransfusioniert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich auch in der Tiermedizin verwenden. Dabei sind unterschiedlichste Tierarten und auch Konstellationen von Tierpatienten und Spendern als Quelle der T-Zell enthaltenden Suspension denkbar.  
20

Vorteilhaft ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem die Antigene, welche Proteine oder Peptide sind, aus Mikroorganismen, aus Makroorganismen, aus Zellen, Zellkulturen und / oder Geweben von Spendern oder Patienten stammen. Mikroorganismen sind zum Beispiel  
25 Viren, Bakterien, Pilze, Einzeller, Parasiten. Unter Makroorganismen fallen zum Beispiel alle mehrzelligen Eukaryoten. Gerade diese Quelle ist für die Beeinflussung von Allergien wichtig. Hierunter fallen Tiere und Pflanzen. Es können Zellen, Zellkulturen oder auch ganze Gewebe bestehend aus einer oder mehreren Schichten oder Zell-Typen verwendet werden.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem die T-Zell-Zytokine vom Typ Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha) oder Interleukin 2 sind. Jedoch sind auch andere Zytokine möglich. Hier ist allein von Bedeutung, daß diese Zytokine  
35 fluoreszenzmarkiert werden können.

- Auch können Aktivierungsmarker identifiziert werden, die aufgrund der T-Zell-Stimulation durch die Proteinfragmente exprimiert oder in der Expression gesteigert werden. Der Marker CD69 ist hierfür beispielhaft. Beim Identifizieren von Aktivierungsmarkern die sich auf der Zelloberfläche befinden oder nicht sekretiert werden ist gegebenenfalls die Inhibition der Sekretion nicht mehr erforderlich.
- 5 Zytokine und Oberflächenmarker sind ausführlich beschrieben in Abul K. ABBAS et al. (1997) Cellular and Molecular Immunology, Philadelphia, 3. Auflage, ISBN 0-7216-4024-9.
- 10 Mehr bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, bei dem die T-Zell-Zytokine nach einer Inhibition der Sekretion intrazellulär vorliegen. Bedeutsam ist, daß die erfolgte Stimulation eindeutig T-Zellen zuzuordnen ist.
- 15 Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, wobei die Stimulation mittels eines Durchflußzytometers erfaßt wird. Wesentlich ist dabei das Prinzip, daß Marker, die sich in der Zelle oder auf deren Oberfläche befinden, wie beispielsweise Zytokine oder Oberflächenmarker mit einem spezifischen Detektor, zum Beispiel einem Antikörper in Kontakt treten, wobei
- 20 der Detektor mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladen ist. Nach Anregung dieses Fluoreszenzfarbstoffes auf den in einem Flüssigkeitsstrom fokussierten Zellen durch Laserlicht zeichnet das Durchflußzytometer die emittierten Streulicht und Fluoreszenzsignale auf, was die zeitgleiche oder spätere Analyse der Zellen ermöglicht. Ausführlich sind solche Techniken beschrieben in Howard M. SHAPIRO
- 25 (1995) Practical Flow Cytometry, New York, 3. Auflage, ISBN 0-471-30376-3. Die Detektion der intrazellulären Zytokine ist beschrieben in L. J. PICKER et al. (1995) Blood, Vol. 86, pp 1408.

#### **Herstellung von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten**

- 30 Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von einem Proteinfragment, das T-Zell-stimulierend ist und nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten gefunden worden ist, wobei das Proteinfragment mit der Festphasenmethode, der Flüssigphasenmethode oder
- 35 mittels der Proteinbiosynthese in einem Wirt hergestellt wird.

Festphasen-Synthese: Die Festphasen-Synthese ist ausführlich beschreiben in Solid Phase Synthesis, E. ATHERTON and R.C. SHEPPARD (1989) IRL Press, ISBN 1-85221-133-4 und Amino Acid and Peptide Syntheses, J. JONES, Oxford Science Publication (1992) ISBN 0-19-855668-3.

- 5 Flüssigphasen-Synthese: Die Flüssigphasen-Synthese oder Lösungstechnik ist in Methoden der Organischen Chemie (HOUBEN/WEYL), Bd. 15 / Nr. 1 und 2, E. WÜNSCH (Herausgeber), Thieme Verlag Stuttgart, 1974 dargestellt.

- 10 Abkürzungen: Die im Text verwendeten Abkürzungen sind durch die Regeln bestimmt, die von der IUPAC-IUB Kommission für biochemische Nomenklatur festgelegt worden sind (Biochemistry 11: 1726 (1972) und Biochem. J. 219: 345 (1984)). Folgende übliche Abkürzungen werden verwendet: Ala = A = Alanin; Arg = R = Arginin; Asn = N = Asparagin; Cys = C = Cystein; Gln = Q = Glutamin; Glu = E = Glutaminsäure; Gly = G = Glycin; His = H = Histidin; Ile = I = Isoleucin; Leu = L = Leucin; Lys = K = Lysin; Met = M = Methionin; Phe = F = Phenylalanin; Pro = P = Prolin; Ser = S = Serin; Thr = T = Threonin; Trp = W = Tryptophan; Tyr = Y = Tyrosin und Val = V = Valin.

- 20 Vorteilhaft ist, wenn die Proteinfragmente, die an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden präsentiert werden, je nach Ende, Amino-Schutzgruppen oder Carboxyl-Schutzgruppen oder deren Varianten aufweisen.

Die Schutzgruppe oder deren Varianten für den N-Terminus kann bestehen aus:

Alkyl-, Aryl-, Alkylaryl-, Aralkyl-, Alkylcarbonyl- oder Arylcarbonylgruppen mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, bevorzugt sind Naphthoyl-, Naphthylacetyl-, Naphthylpropionyl-, Benzoylgruppe oder einer Acylgruppe mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen.

- 25 Die Schutzgruppe oder deren Varianten für den C-Terminus können bestehen aus: Einer Alkoxy- oder Aryloxygruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder aus einer Aminogruppe.

Proteinfragmente, die an MHC-I-Moleküle gebunden präsentiert werden, sollten keine Schutzgruppe tragen.

30

### Verwendung von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten als Medikament

- Besonders bevorzugt ist die Verwendung von einem Proteinfragment, das nach dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren produziert worden ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Immunstimulation.
- 35

Am meisten bevorzugt ist die Verwendung eines Proteinfragmentes, wobei die Immunstimulation in eine Vakzinierung oder Desensibilisierung ist.

- Die Vakzinierung besteht darin, daß als Antigen Proteine von Viren, Bakterien eukaryotischen Einzellern oder Vielzellern nach der Ermittlung ihrer Sequenz in Proteinfragmente aufgeteilt werden, die gemäß der Erfindung zu T-Zell-enthaltenden Suspensionen gegeben werden. Die positiven Ansätze, in denen sich ein T-Zell-stimulierendes Proteinfragment befindet, werden als Ausgangspunkt für die Herstellung eines Vakzins verwendet.
- 10 Die Desensibilisierung besteht darin, daß Proteinfragmente ermittelt werden, die die unerwünschte, immunologische Reaktion auslösen. Anschließend werden die T-Zell-stimulierenden Proteinfragmente dem Patienten verabreicht. Der jeweils gewünschte Effekt (Stimulation oder Desensibilisierung) wird über die Art und den Ort der Anwendung sowie die Dosis (z.B. Hochdosis- oder Niedrigdosistoleranzinduktion) und
- 15 die begleitende Verabreichung beispielsweise stimulierender oder tolerisierender Zytokine oder ähnlicher immunmodulatorisch aktiver Medikamente erreicht bzw. verstärkt. Proteinfragmente, die nicht nach diesem erfindungsgemäßen Verfahren aufgefunden worden sind, wurden bereits erfolgreich als Medikamente eingesetzt, so z.B. bei der Vakzinierung von Rindern gegen Maul- und Klauenseuche (Collen et al.; J
- 20 Immunol 1991; 146:749-755). Das in unserem Beispiel identifizierte Peptid wurde parallel durch konventionelle Technik von einer anderen Gruppe gefunden und befindet sich als Vakzine in Erprobung (Diamond et al. Blood 1997; 5:1751-1767).

## Beispiele

Mononukleäre Zellen wurden aus dem durch venöse Punktion gewonnenen peripheren Blut einer HLA-typisierten Patientin präpariert, welche das MHC-Klasse-I Allel HLA-A\*0201 besaß. Die Patientin besaß außerdem Antikörper gegen das humane Cytomegalie-Virus. Die nach Standardmethode präparierten Zellen wurden für sechs Stunden unter optimierten Bedingungen mit den unten angegebenen Peptiden inkubiert. Diese stellen Bruchstücke eines aus der Literatur bekannten Peptids von 15 Aminosäuren Länge dar (Ala Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn), welches der Proteinsequenz des pp 65-Proteins des humanen Cytomegalie-Virus entstammt (pp65<sub>493-507</sub>). Dieses Peptid ist bekannt dafür, daß es in der Bulk-Kultur HLA-A2 restringierte, zytotoxische T-Zellen induzieren kann, also ein mit HLA-A2 präsentiertes T-Zell-Epitop enthält (M. R. WILLS et al. (1996) J. Virol. Vol. 70, pp 7569-5779). Die Länge von 9 Aminosäuren für die zu testende Bruchstücke wurde gewählt, da dieses die typische Länge von Epitopen ist, welche mit MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden (H. G. RAMMENSEE et al. (1995) Immunogenetics, Vol 41, pp 178-228). Die verwendeten Peptide überlappen sich um jeweils 8 Aminosäuren und stellen somit alle möglichen Bruchstücke dieser Länge dar. Die Peptide wurden als Mischung aus allen Peptiden oder einzeln eingesetzt. Die Peptidkonzentration im gezeigten Beispiel betrug 1 µg/ml je Peptid.

Folgenden Peptide wurden eingesetzt:

- 1) Ala Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala
- 2) Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr
- 3) Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
- 4) Leu Val pro Met Val Ala Thr Val Gln
- 5) Val pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly
- 6) pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln
- 7) Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn

Die Inkubation mit der Mischung aus allen Peptiden (Abbildung: Diagramm oben links) sowie Peptid 3 allein (Abbildung: Diagramm in der Mitte, zweites von oben) führten zur Produktion von IFN-γ in T-Zellen, welches durch Messung am Durchflußzytometer auf Einzel-Zellebene (J. L. PICKER et al., (1995) Vol 86, pp 1408-1419) nachgewiesen wurde. Keines der anderen einzeln getesteten Peptide hatte diesen Effekt. Eine in der Literatur veröffentlichte Untersuchung identifizierte exakt das gleiche Epitop innerhalb

das gleichen Proteinsegmente durch konventionelle Methoden und bestätigt unser Ergebnis eindeutig (D. J. DIAMOND et al. (1997) Blood, Vol 90, pp 1751-1767).

Legende zur Abbildung:

- 5 Darstellung: Detektion von intrazellulär vorliegendem Interferon- $\gamma$  in CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten nach Stimulation mit der Mischung aus den 7 angegebenen Peptiden (Oben, ganz links) beziehungsweise den einzelnen Peptiden, pp65<sub>493-501</sub> bis pp65<sub>499-507</sub>.

10

15

## Patentansprüche

- 17
1. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten, die folgenden Schritte umfassend:
- 5
- a) Ermitteln der Aminosäuresequenz eines Antigens, welches ein Protein oder Peptid ist,
- b) Unterteilen der gefundenen Aminosäuresequenz des Antigens in Proteinfragmente,
- 10
- c) Synthetisieren von mindestens einem Proteinfragment mit einer Länge von 8 bis 30 Aminosäuren oder Spalten der Aminosäuresequenz des Antigens zu mindestens einem Proteinfragment mit einer Länge von 8 bis 30 Aminosäuren, dabei ist das Proteinfragment eine Teilsequenz der ermittelten Aminosäuresequenz des Antigens,
- 15
- d) Inkubieren einer T-Zell enthaltenden Suspension mit dem oder den Proteinfragmenten in Versuchsansätzen,
- e) Identifizieren
- (i) von mindestens einem T-Zell-Zytokin, das durch das oder die Proteinfragmente induziert und in den T-Zellen synthetisiert wurde, dabei liegen das oder die T-Zell-Zytokine intrazellulär vor, und / oder
- 20
- (ii) von mindestens einem Aktivierungsmarker, der durch das oder die Proteinfragmente induziert oder in seiner Expression gesteigert wurde und in den T-Zellen exprimiert wird, dabei kann der Aktivierungsmarker intrazellulär vorliegen oder auf der Zelloberfläche exprimiert sein
- dabei werden das oder die T-Zell-Zytokine oder Aktivierungsmarker durchflußzytometrisch identifiziert, und
- 25
- 30
- f) Zuordnen der Versuchsansätze, bei denen T-Zellen stimuliert wurden und diese T-Zell-Stimulation durch das Identifizieren von einem T-Zell-Zytokin oder mehreren T-Zell-Zytokinen und / oder einem oder mehreren Aktivierungsmarkern erkannt wurde, zu der oder den Aminosäuresequenzen der Proteinfragmente, welche mit den T-Zellen inkubiert wurden.
- 35

2. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach Anspruch 1, wobei das Identifizieren von mindestens einem T-Zell-Zytokin oder Aktivierungsmarker auf der Einzelzell-Ebene erfolgt.
- 5 3. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zell enthaltende Suspensionen Zellen enthalten,  
10 die das Proteinfragment im wesentlichen an MHC-Klasse-I oder Klasse-II-Moleküle gebunden präsentieren.
- 15 4. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das Proteinfragment bei der Klasse I restringierten Präsentation 9 bis 11 Aminosäuren umfaßt und das Proteinfragment bei der Klasse II restringierten Präsentation mindestens 11 Aminosäuren umfaßt.
- 20 5. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zell enthaltende Suspension eine Suspension ist aus  
Vollblut, peripheren weißen Blutzellen (PWBC), Milzzellen, Thymuszellen, Knochenmark, Liquor und / oder aus Lymphknotenzellen.
- 25 6. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zell enthaltende Suspension aus den Patienten, die therapiert werden sollen, aus Spendern oder aus Tieren stammen.
- 30 7. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Antigene, welche Proteine oder Peptide sind aus Makroorganismen, aus Zellen, Zellkulturen und / oder Geweben von Spendern oder Patienten stammen.



8. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zell-Zytokine vom Typ Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  oder Interleukin 2 sind.
- 5 9. Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die T-Zell-Zytokine nach einer Inhibition der Sekretion intrazellulär vorliegen.
- 10 10. Verfahren zum Herstellen von einem Proteinfragment, das T-Zell-stimulierend ist und nach dem Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten gemäß einem der vorherigen Ansprüche 1 bis 9 gefunden worden ist,  
wobei das Proteinfragment mit der Festphasenmethode, der Flüssigphasenmethode oder mittels der Proteinbiosynthese in einem Wirt hergestellt wird.
- 15 11. Verwendung von einem Proteinfragment, das nach dem Verfahren gemäß dem Anspruch 10 hergestellt worden ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Immunstimulation.
- 20 12. Verwendung von einem Proteinfragment nach Anspruch 11, wobei die Immunstimulation eine Vakzinierung oder Desensibilisierung ist.
- 25

# Ausfuehrungsbeispiel ● Abbildung

zur Patentanmeldung "Verfahren zum Identifizieren von T-Zell-stimulierenden Proteinfragmenten"

